

**PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE DAN KADAR MALONDIALDEHID
(MDA) PADA GINJAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG
DIINDUKSI DIAZINON**

SKRIPSI

Oleh :

ILA KURNIA DEWI

145130100111028



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

**PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE DAN KADAR MALONDIALDEHID (MDA) PADA
GINJAL TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI DIAZINON**

SKRIPSI

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh :

ILA KURNIA DEWI

145130100111028



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Aktivitas Protease dan Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon

Oleh :

ILA KURNIA DEWI

NIM. 145130100111028

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 10 Agustus 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Dra. Anna Roosdiana, M. App, Sc

NIP. 19580711 199203 2 002

Pembimbing II

drh.Viski Fitri/Hendrawan, M.Vet

NIP. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : ILLA KURNIA DEWI
NIM : 145130100111028
Program Studi : Pendidikan Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap
Aktivitas Protease Dan Kadar *Melomaculide-hyde* (NIDA) pada Ghajal Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon.


Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil iplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Agustus 2018

Yang menyatakan,


ILLA KURNIA DEWI
145130100111028

Illia Kurnia Dewi

Nim. 145130100111028

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan kegiatan serta menyusun skripsi dengan judul “ **PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN KADAR MALONDIALDEHID (MDA) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DIAZINON**” dengan lancar.

Skripsi ini disusun berdasarkan literatur yang penulis peroleh dari berbagai referensi. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Dra. Anna Roosdiana, M. App, Sc .selaku dosen pembimbing I yang telah bersedia membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
2. drh.Viski Fitri Hendrawan, M.Vet. selaku dosen pembimbing II yang telah bersedia membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
3. drh. Ajeng Erika P. H., M.Si., selaku dosen penguji I yang telah menyisihkan waktu untuk menguji dalam seminar proposal dan hasil skripsi ini.
4. drh. Fidi Nur Aini E. P. D., M. Si., dosen penguji II yang telah menyisihkan waktu untuk menguji dalam seminar proposal dan hasil skripsi ini
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dukungan, dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
7. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
8. Kepada sahabat Lebah Madu Sumbawa yaitu Firdausi, Ilham, Arif, dan Aisyah yang selalu memberikan semangat dan dukungan yang selalu diberikan kepada penulis selama penyelesaian skripsi ini.
9. Kepada seluruh sahabat-sahabat penulis terima kasih untuk kontribusi, waktu dan semangat yang selalu diberikan.

10. Seluruh kolegium Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya teman-teman kelas 2014 C terimakasih atas dukungan, semangat, inspirasi dan keceriaan yang diberikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap bahwa skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 10 Agustus 2018

Penulis



**Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Aktivitas Protease Dan
Kadar Malondialdehid (MDA) pada Ginjal Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon**

ABSTRAK

Diazinon merupakan salah satu organofosfat yang biasa digunakan oleh petani untuk membasmi hama. Penggunaan insektisida yang berlebih memungkinkan terjadinya residu pada tanaman yang dapat membahayakan kesehatan. Diazinon yang masuk ke dalam tubuh akan menjadi zat xenobiotik dan akan termetabolisme oleh tubuh. Paparan diazinon secara terus-menerus dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel-sel tubuh termasuk ginjal. Madu sumbawa diketahui mengandung antioksidan seperti flavonoid, polivenol, dan vitamin C sehingga dapat digunakan untuk menangkap radikal bebas dan meningkatkan kadar antioksidan yang diperlukan oleh tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas pemberian madu sumbawa pada tikus yang diinduksi diazinon berdasarkan kadar MDA dan aktivitas protease ginjal tikus. Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat 130-180 gram. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif yang tidak diinduksi diazinon dan madu sumbawa. Sedangkan kelompok 2, 3, 4, dan 5 merupakan kelompok yang diinduksi diazinon dengan dosis 20 mg/kgBB selama 7 hari. Kelompok 2 sebagai kelompok kontrol positif tidak diberikan terapi madu sumbawa. Sedangkan pada kelompok 3 diberikan terapi madu sumbawa dengan konsentrasi 25%, pada kelompok 4 diberikan terapi madu sumbawa dengan konsentrasi 50%, dan pada kelompok 5 diberikan terapi madu sumbawa dengan konsentrasi 75%. Terapi madu sumbawa diberikan selama 14 hari sebanyak 1 ml setiap harinya. Kesimpulan dari penelitian ini dapat diketahui 1 ml madu Sumbawa dengan konsentrasi 25% mampu menurunkan aktivitas protease sebesar 23% dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) sebesar 40% pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.

Kata kunci : *aktivitas protease, diazinon, ginjal, madu sumbawa, MDA.*

The Influence of Giving Sumbawa Honey Toward Protease Activity and Malondialdehyde (MDA) in Kidney of *Rattus norvegicus* Induced Diazinon

ABSTRACT

Diazinon is one of organophosphate which used to eradicate of pest. Usage the excess insecticide allows the occurrence of residues on plants that can harm health. Diazinon is metabolized by the body. Exposure to diazinon continuously can cause oxidative stress on the cells of body including the kidneys. Sumbawa honey contains antioxidants like vitamin C, flavonoids, and poliphenol that can netralize the oxidant and increase the levels of antioxidants. This research aimed to knew the effectiveness of Sumbawa honey administrated in rat induced diazinon based on the levels of MDA and protease activity of rats kidney. The rats used in the study was a rat (*Rattus norvegicus*) males weighing 130-180 grams. The group 1 was a group of negative control which was not induced diazinon and Sumbawa honey. The group 2, 3, 4, and 5is group that induced diazinon 20 mg/kgBB. Group 2 as a positive control group not given the therapy Sumbawa honey. In the group 3 given sumbawa honey with concentration 25%, in group 4 given sumbawa honey with concentration 50%, and group 5 given sumbawa honey with concentration 75%. Sumbawa honey therapy has given 1 ml every day for 14 days. The reslt from this experience is 1 ml Sumbawa honey with 25% concentrations can increase activity of protease 23% and increase level of Mallondialdehyde (MDA) to 40% in a rat (*Rattus norvegicus*) induced diazinon.

Key word: diazinon, kidney, MDA, Sumbawa honey, protease activity.

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah.....	3
1.4. Tujuan.....	4
1.5. Manfaat.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Diazinon.....	6
2.2. Mekanisme Toksisitas Diazinon.....	6
2.3. Ginjal.....	8
2.4. Hubungan Malondialdehid (MDA) Dengan Residu Diazinon.....	10
2.5. Hubungan Aktivitas Protease dengan Residu Diazinon.....	11
2.6. Madu Sumbawa.....	11
2.7. Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	15
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	16
PENELITIAN	16
3.1. Kerangka Konseptual.....	16
3.2. Hipotesis Penelitian.....	19
BAB 4. METODE PENELITIAN	20
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
4.2. Rancangan Penelitian.....	20
4.3. Alat dan Bahan.....	22
4.4. Tahapan Penelitian.....	22
4.5. Variabel Penelitian.....	23
4.6. Prosedur Kerja.....	23
4.6.1. Persiapan Hewan Coba.....	23
4.6.2. Induksi Diazinon.....	24
4.6.3. Terapi Madu Sumbawa.....	24
4.6.4. Pengambilan Sampel Organ Ginjal.....	25
4.6.5. Isolasi Protease.....	25

4.6.6. Pengukuran Aktivitas Protease.....	26
4.6.7. Pengukuran Kadar MDA.....	26
4.6.8. Analisa Data.....	27
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
5.1. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Aktivitas Protease pada Ginjal Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Diazinon.....	28
5.2. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Kadar <i>Mallondialdehyde</i> (MDA) pada Ginjal Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Diazinon	35
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
6.1. Kesimpulan.....	41
6.2. Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	46



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian.....	21
Tabel 5.1. Rata-rata Aktivitas Protease Ginjal Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	29
Tabel 5.2. Rata-rata Kadar <i>Mallondialdehyde</i> Ginjal Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	36



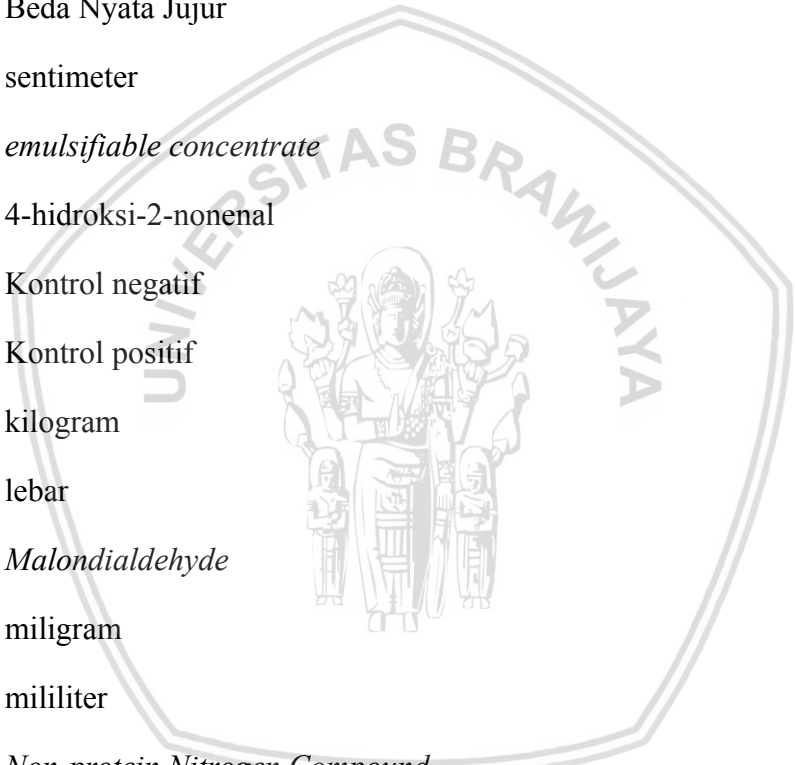
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Metabolisme Diazinon.....	8
Gambar 2.2. Anatomi Ginjal.....	9



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional penelitian.....	49
Lampiran 2. Laik Etik Penelitian.....	50
Lampiran 3. Hasil Uji Fitokimia Madu Sumbawa.....	51
Lampiran 4. Hasil Uji Total Flavonoid Madu Sumbawa.....	53
Lampiran 5. Perhitungan Aktivitas Protease.....	54
Lampiran 6. Perhitungan Kadar MDA.....	57
Lampiran 7. Perhitungan Dosis Diazinon.....	60
Lampiran 8. Dosis Madu.....	61
Lampiran 9. Pengambilan Organ Ginjal.....	62
Lampiran 10. Pengukuran Kadar MDA.....	63
Lampiran 11. Isolasi Protease.....	64
Lampiran 12. Pengukuran Aktivitas Protease.....	65
Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian.....	66

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

α	: alfa
$^{\circ}\text{C}$: derajat celcius
μl	: mikroliter
BB	: Berat badan
BNJ	: Beda Nyata Jujur
cm	: sentimeter
EC	: <i>emulsifiable concentrate</i>
HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
K-	: Kontrol negatif
K+	: Kontrol positif
kg	: kilogram
l	: lebar
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
mg	: miligram
ml	: mililiter
NPN	: <i>Non-protein Nitrogen Compound</i>
p	: panjang
P1	: Perlakuan 1
P2	: Perlakuan 2
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
t	: tinggi

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diazinon merupakan salah satu organofosfat yang biasa digunakan oleh petani untuk membasmi hama. Diazinon merupakan insektisida organofosfat yang bersifat toksik (Djumadi, 2008). Insektisida digunakan untuk peningkatan produksi tanaman, namun penggunaan yang tidak sesuai atau berlebih dapat menyebabkan residu pada tanaman yang berbahaya bagi kesehatan (Wulandari, 2006). Menurut Yuningsih (2010), diazinon masih banyak digunakan oleh masyarakat dan terdeteksi adanya pestisida pada pakan ternak. Diazinon telah dilaporkan menyebabkan kematian pada ayam di Sukabumi, Bogor, dan Garut pada tahun 1998 (Yuningsih & Sri Yulastuti, 1998).

Menurut Yuningsih (2010), efek terhadap hewan dapat berupa keracunan akut akibat terhambatnya enzim asetilkolinesterase yang berfungsi memecah neurotransmitter asetilkolin (ACh). Asetilkolin yang tidak terhidrolisis dapat menyebabkan hantaran impuls yang tertunda sehingga produksi salivasi berlebih, diare, kejang, kelumpuhan, dan berakhir kematian (Wulandari, 2006).

Pengobatan yang dapat dilakukan untuk mengatasi ternak yang mengkonsumsi diazinon saat ini dilakukan saat terjadinya gejala akut dari toksik yaitu antidot golongan oksim (prolidoksim, oksidoksime, HI-6 dan HLo7) yang bekerja sebagai reaktivator asetilkolinesterase yang cocok untuk keracunan akut. Sedangkan pengendalian efek biokimia asetilkolin dengan

menggunakan atropin. Atropin merupakan antagonis reseptor muscarinic dan tidak efektif untuk efek nikotinic organofosfat (Sinha, 2003).

Ginjal merupakan organ dalam tubuh yang salah satu fungsinya yaitu mensekresikan zat yang tidak berguna hasil metabolisme dan zat-zat yang tidak berbahaya bagi tubuh (Davey, 2005). Ginjal yang mendapat paparan diazinon akan menghasilkan radikal bebas. peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif. Stress oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara ROS dan antioksidan baik enzimatis ataupun non enzimatis. stres oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi lipid. Lipid peroksida merupakan bentuk dari senyawa yang bersifat tidak stabil, sehingga dapat dengan mudah diurai menjadi kompleks senyawa salah satunya Malondialdehid (MDA). Selain itu, stres oksidatif menyebabkan nefrotoksik dan mempengaruhi aktivitas protease ginjal (Wati, 2013). Kerusakan ginjal yang terjadi akibat paparan diazinon antara lain yaitu, terjadinya peningkatan peroksidasi lipid ginjal, penurunan aktivitas antioksidan ginjal, peningkatan aktivitas transpeptidase c-glutamil dan reduktase quinon (Shah, 2010).

Madu sumbawa dikenal banyak mengandung zat-zat yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan madu diantaranya adalah air, glukosa, fruktosa, vitamin, mineral, protein, flavonoid dan alkaloid. Kementerian Kehutanan telah menetapkan Sumbawa sebagai klaster madu nasional sehingga nilai madu sumbawa di level nasional. Madu Sumbawa didapat dari hutan-hutan Sumbawa. Sumbawa terletak pada geografis yang membuat madu Sumbawa berbeda dengan lainnya (Zulhawa, 2010). Menurut Legowo (2015), madu memiliki efek antioksidan karena mengandung vitamin C, flavonoid,

polifenol, mangan, betakaroten dan masih banyak zat aktif lain yang mampu melindungi sel dalam tubuh dengan cara menetralkan radikal bebas.

Berdasar latar belakang tersebut, penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efektivitas pemberian madu sumbawa terhadap tikus yang diinduksi diazinon. Hasil yang didapat diharapkan adanya penurunan aktivitas protease dan kadar Malondialdehid (MDA) pada organ ginjal yang telah diinduksi diazinon dan diterapi dengan madu sumbawa. Sehingga, diharapkan madu sumbawa dapat sebagai obat alternatif dari toksisitas diazinon.

1.1 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana efektivitas madu Sumbawa dalam menurunkan aktivitas protease ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon?
2. Bagaimana efektivitas madu Sumbawa dalam menurunkan kadar MDA ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon?

1.2 BATASAN MASALAH

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat badan 130-180 gram. Tikus didapat dari Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Bawijaya Malang.
2. Diazinon diinduksikan secara *per-oral* dengan dosis 60 mg/Kg BB tikus per hari selama 7 hari pada hari ke-8.
3. Madu Sumbawa yang digunakan diambil dari hutan Sumbawa dari nektar pohon Bidara, kemudian diuji fitokimia di Balai Materia Medica Batu Malang.
4. Madu Sumbawa diinduksikan secara *per-oral* dengan dosis sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% yang diberikan selama 10 hari pada hari ke-15 sampai hari ke-25.

5. Parameter yang diamati adalah aktivitas Protease dan kadar Malondialdehid (MDA) pada organ ginjal.
6. Penentuan nilai aktivitas protease menggunakan pereaksi Trikloroasetat (TCA).

1.3 TUJUAN

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui efektifitas Madu Sumbawa dalam menurunkan aktivitas protease ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
2. Untuk mengetahui efektifitas Madu Sumbawa dalam menurunkan kadar Malondialdehid (MDA) ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.

1.4 MANFAAT

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui efektifitas Madu Sumbawa terhadap aktivitas protease dan kadar Malondialdehid (MDA) ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
2. Untuk menghasilkan produk yang dapat membantu mengobati toksisitas pada ternak akibat mengkonsumsi pakan yang terpapar organofosfat diazinon.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diazinon

Diazinon merupakan insektisida organofosfat yang banyak digunakan dalam bidang pertanian untuk membasmi hama pengganggu (Himawan, 2012). Diazinon merupakan salah satu organofosfat insektisida yang bersifat toksik. Diazinon dapat masuk ke dalam tubuh melalui kulit, paru-paru, dan saluran cerna (Djumadi, 2008).

Diazinon dalam bidang pertanian digunakan untuk membasmi serangga juga dapat digunakan dalam bidang peternakan untuk membasmi serangga di dalam tanah dan ektoparasit. Mekanisme kerja diazinon yaitu dengan cara menghambat enzim kolinesterase secara irreversibel. Enzim kolinesterase ini berfungsi untuk memecah asetilkolin yang merangsang saraf otot (Usman, 2013). Diazinon memberikan efek terhadap hewan dapat berupa keracunan akut akibat terhambatnya enzim asetilkolinesterase yang berfungsi memecah neurotransmitter asetilkolin (ACh) (Yuningsih, 2010). Asetilkolin yang tidak terhidrolisi dapat menyebabkan hantaran impuls yang tertunda sehingga akan mengakibatkan salivasi berlebih, diare, kejang, kelumpuhan, dan berakhir kematian (Wulandari, 2006).

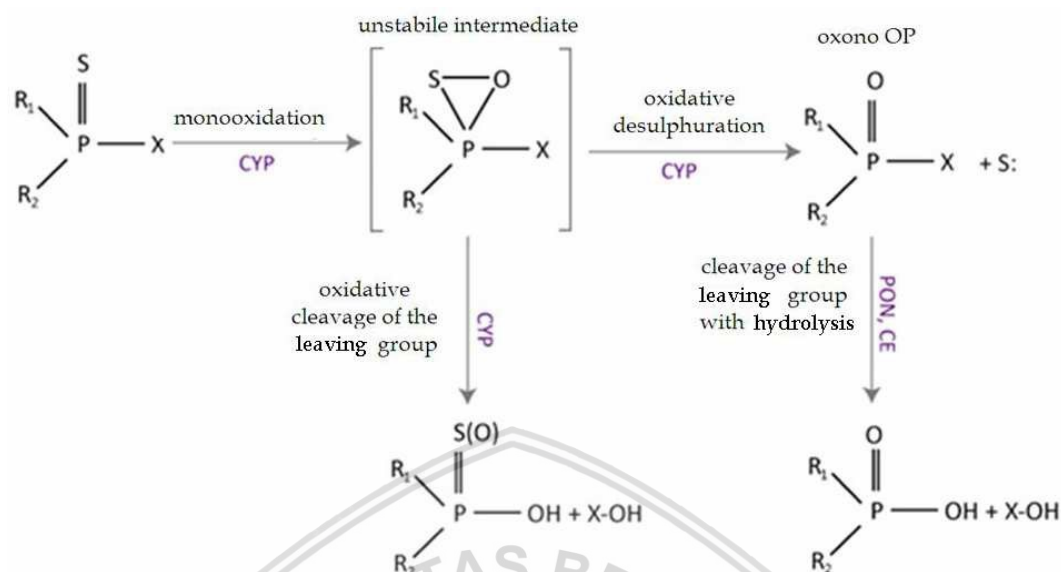
2.2 Mekanisme Toksisitas Diazinon

Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh (Wulandari, 2006). Metabolisme diazinon sama seperti OP lain terjadi di hepar dan usus. Metabolisme xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase I dimana enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenai

gugus fungsi OP dan fase II merupakan proses perubahan struktur OP menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin, dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi (Wulandari,2006). Menurut Elersek (2011), menyatakan bahwa metabolisme organofosfat fase I terdiri dari reaksi oksidasi yang merupakan suatu reaksi aktivasi thiono-organofosfat menjadi okson organofosfat dan atom sulfur dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP) sehingga okson organofosfat menjadi molekul aktif yang mampu menghambat fungsi dari AChE. Reaksi hidrolisis termasuk dalam metabolisme fase I, dimana hidrolisis terjadi setelah reaksi oksidasi berlangsung dengan bantuan enzim *paraoxonase* (PON) reaksi ini penting untuk proses detoksifikasi.

Oksidasi diazinon merupakan suatu reaksi aktivasi thiono-organofosfat menjadi okson organofosfat dan atom sulfur dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP) sehingga okson organofosfat menjadi molekul aktif yang mampu menghambat fungsi dari AChE. Atom sulfur dalam bentuk tiono akan berikatan dengan atom oksigen yang mengakibatkan organofosfat bersifat tidak stabil dan terpecah membentuk Oksono organofosfat dan ion S bebas. Oksono organofosfat berperan dalam agen neurotoksik dengan menghambat AChE (Elersek, 2011).

Hidrolisis merupakan proses yang terjadi setelah berlangsungnya proses oksidasi untuk proses detoksifikasi organofosfat. Reaksi hidrolisis terjadi ketika *paraoxonase-1* (PON1) memecah struktur organofosfat menjadi dialkilfosfat dan *leaving grup* (Elersek, 2011).



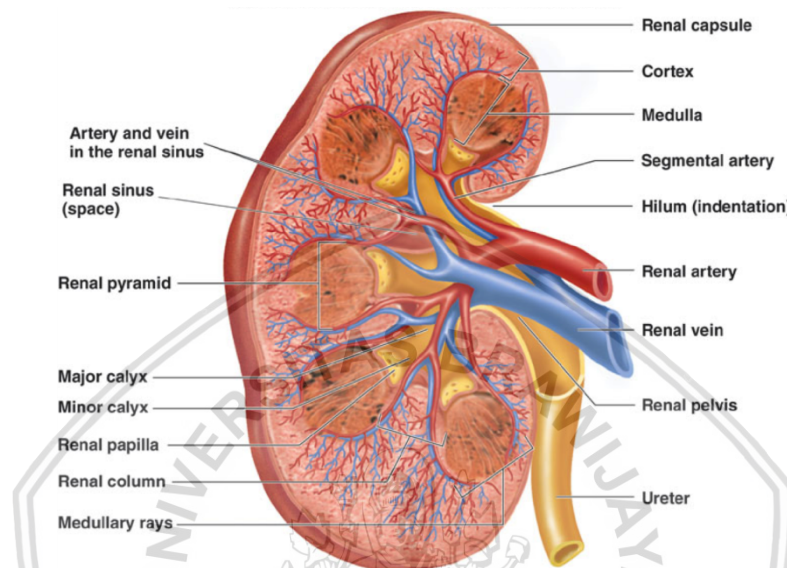
Gambar 2.1. Metabolisme diazinon (Poet *et. al.*, 2004)

P adalah fosfat, jika berikatan dengan S menjadi ikatan *thiophosphoric*. X merupakan *leaving group* yang akan digantikan oleh substansi nukleofilik oleh oksigen serin pada sisi aktif AcHE. R₁ dan R₂ biasanya merupakan grup alkoksi.

2.3 Ginjal

Ginjal merupakan organ yang terdiri dari korteks dan medulla. Korteks ginjal berwarna lebih gelap dan terletak dibagian luar sedangkan medulla merupakan bagian yang lebih terang dan terletak di dalam. Pelvis renalis terletak pada medulla renalis dengan bentuk krucut. Pelvis renalis akan menghubungkan ginjal dengan ureter sehingga urin akan masuk ke dalam vesica urinaria. Ginjal memiliki kurang lebih satu juta nefron dan setiap nefron memiliki glomerulus. Glomerulus yang terbentuk dari unit kapiler sehingga membentuk kapsula bowman. Terdapat arteriola afferent dan arteriola efferen pada glomerulus tubulus ginjal terdapat arteriola yaitu arteriola afferent yang berfungsi membawa darah

masuk ke dalam glomerulus, sedangkan arteriola efferent berfungsi membawa darah keluar dari glomerulus, serta kapiler peritubulus yang membawa darah ke jaringan ginjal (Verdiansah,2016).



Gambar 2.2. Anatomi ginjal (Heritance., 2018)

Ginjal memiliki beberapa fungsi yaitu mensekresikan zat yang tidak berguna hasil metabolisme dan zat-zat yang tidak berbahaya bagi tubuh, mempertahankan kandungan darah yang masih diperlukan. Selain itu ginjal juga memiliki fungsi endokrin. Fungsi ginjal antara lain, yaitu pembuangan *Non-protein Nitrogen Compound* (NPN) yang merupakan sisa hasil metabolisme yang berupa urea, kreatinin, dan asam urat. Ginjal mengatur keseimbangan air dan elektrolit seperti natrium, kalium, klorida, fosfat, kalsium, dan magnesium. Ginjal juga berperan dalam pengaturan keseimbangan asam basa serta berfungsi sebagai organ endokrin yang mensintesa renin, eritropoietin, prostaglandin, dan *1,25 dihydroxy vitamin D3* (Verdiansah, 2016)

Kerusakan ginjal yang terjadi akibat paparan diazinon antara lain yaitu, terjadinya peningkatan peroksidasi lipid ginjal; penurunan aktivitas antioksidan ginjal seperti katalase, glutathion peroksidase, glutathion reduktase, glukosa-6-fosfat dehidrogenase, dan glutathione S-transferase; peningkatan aktivitas transpeptidase c-glutamil dan reduktase quinon. Sedangkan secara histopatologi akan tampak penyempitan Bowmans, degenerasi sel epitel tubular dan pelebaran lumen tubulus disertai nekrosis pada tubulus proksimal (Shah, 2010).

2.4 Hubungan Malondialdehid (MDA) Dengan Residu Diazinon

Menurut Shah (2010), menyatakan bahwa pemberian diazinon pada tikus dapat menyebabkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid ginjal; penurunan aktivitas antioksidan ginjal seperti katalase, glutathion peroxidase, glutathion reduktase, glukosa-6-fosfat dehidrogenase, dan glutathion S-transferase; peningkatan aktivitas transpeptidase c-glutamil dan reduktase quinon. Sedangkan secara histopatologi akan tampak penyempitan Bowmans, degenerasi sel epitel tubular dan pelebaran lumen tubulus disertai nekrosis pada tubulus proksimal. Semua perubahan tersebut mengarah pada diazinon-mediated renal stres oksidatif dan toksisitas.

Stres oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara *reactive oxygen species* (ROS) dengan antioksidan (Wati, 2013). Peroksidasi lipid terjadi saat stres oksidatif berlangsung. Proses peroksidasi lipid terdiri dari serangkaian tahapan reaksi. Tahap awal proses peroksidasi lipid adalah inisiasi, yaitu reaksi ROS pada PUFA. Reaksi radikal bebas dengan PUFA akan menghasilkan lipid radikal bebas ($R\bullet$) dan air. Lipid radikal bebas yang bereaksi dengan oksigen akan

membentuk radikal lipid peroksida ($\text{ROO}\bullet$). Tahap kedua merupakan tahap propagasi atau pemanjangan rantai radikal. Propagasi akan terjadi secara terus menerus dan menghasilkan radikal bebas ($\text{R}\bullet$) lainnya yang akan bereaksi dengan senyawa lainnya. Apabila radikal peroksid lipid tersebut bereaksi dengan PUFA lain maka akan membentuk peroksidasi lipid hidroperoksida (ROOH) dan lipid radikal bebas yang baru yang dapat bereaksi dengan senyawa lain. Tahapan terakhir yaitu tahap terminasi yaitu tahap bereaksinya atau dengan penangkap radikal, sehingga potensi propagasinya rendah (Lavenia, 2010). Peroksidasi lipid merupakan bentuk dari *polyunsaturated* asam lemak yang bersifat tidak stabil, sehingga dapat dengan mudah diurai menjadi kompleks senyawa salah satunya Malondialdehid (MDA). Malondialdehid (MDA) bersifat mutagenik, tumorigenik, dan bereaksi tinggi saat terjadinya produksi *polyunsaturated* asam lemak dan metabolisme asam arakidonat (Singh, 2014).

2.5 Hubungan Aktivitas Protease dengan Residu Diazinon.

Pemberian diazinon pada tikus akan menyebabkan Semua perubahan yang mengarah pada diazinon-mediated renal stres oksidatif dan toksisitas (Shah, 2010). Stress oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara ROS dan antioksidan baik enzimatis ataupun non enzimatis. Stres oksidatif yang menyebabkan nefrotoksik ini mempengaruhi aktivitas protease ginjal (Wati, 2013). Aktivitas protease secara normal pada ginjal berfungsi untuk memecah matriks protein agar tetap seimbang untuk mencegah terjadinya fibrosis (Azrini, 2012).

2.6 Madu Sumbawa

Madu merupakan cairan kental yang dihasilkan oleh lebah. Madu diperoleh dari nektar bunga ataupun dari bagian tanaman hidup lainnya yang kemudian diolah dengan cara diikat dengan senyawa-senyawa tertentu dan disimpan disarang lebah (Azrizal, 2017).

Komponen utama madu adalah glukosa dan fruktosa, sedangkan komposisi kimia dalam 100mg madu antara lain: karbohidrat 82,5 gram; serat pangan 02 gram; lemak 0 gram; protein 0,3 gram; riboflavin 0,038 mg; niacin 0,121 mg; *Panthotenic Acid* (B5) 0,068 mg; vitamin B6 0,024 mg; Folate (vitamin B9) 2,25 mg; vitamin C 0,5 mg; Kalsium 6 mg; besi 0,42 mg; magnesium 2 mg; fosforus 4 mg; potassium 52 mg; sodium 4 mg; dan zinc 0,22 mg. Komponen madu dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, asal geografis, sumber nektar, kondisi lingkungan, iklim, dan teknik pengolahan (Azrizal, 2011).

Madu Sumbawa dikenal sebagai madu terbaik di Indonesia karena madu diperoleh dari hutan Sumbawa. Madu Sumbawa dihasilkan oleh lebah-lebah hidup di hutan Sumbawa, sehingga memperoleh makanan secara alami dari hutan. Sumbawa terkenal dengan hutan bidara atau *Ziziphus mauritiana*. Sumbawa juga memiliki letak geografis yang kering dan rendah, sehingga kadar air dalam madu Sumbawa rendah (Zulhawa, 2010). Bidara merupakan tumbuhan yang dilaporkan memiliki kandungan flavonoid tinggi sehingga memiliki aktivitas antikanker, antiinflamasi, antifungi, dan antioksidan (Haeria, 2016).

Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, E, polifenol, mangan, flavonoid, dan beberapa antioksidan lain. Antioksidan akan

menurunkan dampak negatif dari oksidan dengan cara memberikan elektronnya sehingga akan mengubah oksidan menjadi molekul yang tidak berbahaya. Antioksidan juga mampu mencegah pembentukan radikal bebas dan memperbaiki kerusakan akibat ada radikal bebas. (As'ari, 2009). Menurut Azmi, dkk. (2015), bahwa kekuatan antioksidan terdiri empat bagian yaitu aktif $IC_{50} < 500$ ppm, aktif IC_{50} 50-100 ppm, sedang IC_{50} 250-500 ppm, dan tidak aktif $IC_{50} > 500$ ppm.

Senyawa fenol merupakan suatu senyawa yang mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat langsung pada gugus cincin hidrokarbon aromatik (Dhianawaty, 2013). Polifenol sebagai antioksidan alami dapat menurunkan stres oksidatif dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai perubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida dengan mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksi (-OH) polifenol membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi (Asfari, dkk., 2016).

Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C6-C3-C6. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya (Redha, 2010). Flavonoid merupakan komponen fungsional dari madu secara signifikan berkontribusi terhadap total aktivitas antioksidan (Chayati, 2015). Flavonoid diketahui mampu berperan menangkap radikal bebas atau berfungsi sebagai antioksidan alami. Aktivitas antioksidan tersebut memungkinkan flavonoid untuk menangkap atau menetralkan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) atau *reactive nitrogen species* (RNS) terkait dengan gugus OH fenolik, sehingga dapat memperbaiki keadaan jaringan yang rusak dengan kata lain proses inflamasi dapat terhambat (Asfari, 2016).

Flavonoid juga berperan sebagai antioksidan lipofilik yang berlokasi di kompartemen yang lipofilik seperti membran dan lipoprotein, lebih efektif untuk menangkap radikal yang lipofilik seperti radikal lipid dan radikal peroksil lipid, sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi inisiasi reaksi rantai dan perpanjangan (Yuslianti, 2018).

Vitamin C disebut juga asam askorbat, merupakan vitamin yang paling sederhana, mudah berubah akibat oksidasi, tetapi amat berguna bagi manusia. Struktur kimianya terdiri dari rantai 6 atom C dan kedudukannya tidak stabil ($C_6H_8O_6$), karena mudah bereaksi dengan O_2 di udara menjadi asam dehidroaskorbat. Vitamin C pada tumbuhan merupakan metabolit sekunder, karena terbentuk dari glukosa melalui jalur asam D-glukoronat dan L-gulonat (Cresna, dkk., 2014). Senyawa ini mempunyai berbagai fungsi seperti biosintesis kolagen, absorpsi Fe, aktivasi respon imun, penyembuhan luka, osteogenesis, dan juga berperan sebagai antioksidan yang kuat untuk melawan radikal bebas (Febrianti, 2016). Vitamin C sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, dan radikal hidroksil dan peroksil (Rohdiana, 2001). Asam askorbat juga memiliki kekurangan yaitu jika dikonsumsi dalam jumlah banyak maka dapat memberikan efek negatif seperti iritasi lambung (Febrianti, 2016). Vitamin C dapat menyebabkan diare akibat efek osmotik dari vitamin C yang tidak diserap dalam lumen intestine. Selain itu, oksalat yang

merupakan produk akhir dari katabolisme askorbat dapat menyebabkan pembentukan batu ginjal (Sumbono, 2016).

Madu Sumbawa telah diujikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* (Hudri, 2014). Madu Sumbawa juga telah diujikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Zulhawa, 2015). Madu sumbawa berpotensi sebagai antikanker dan antioksidan (Sumarlin, 2014).

2.7 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Menurut Maula (2014), klasifikasi dari tikus putih yaitu sebagai berikut:

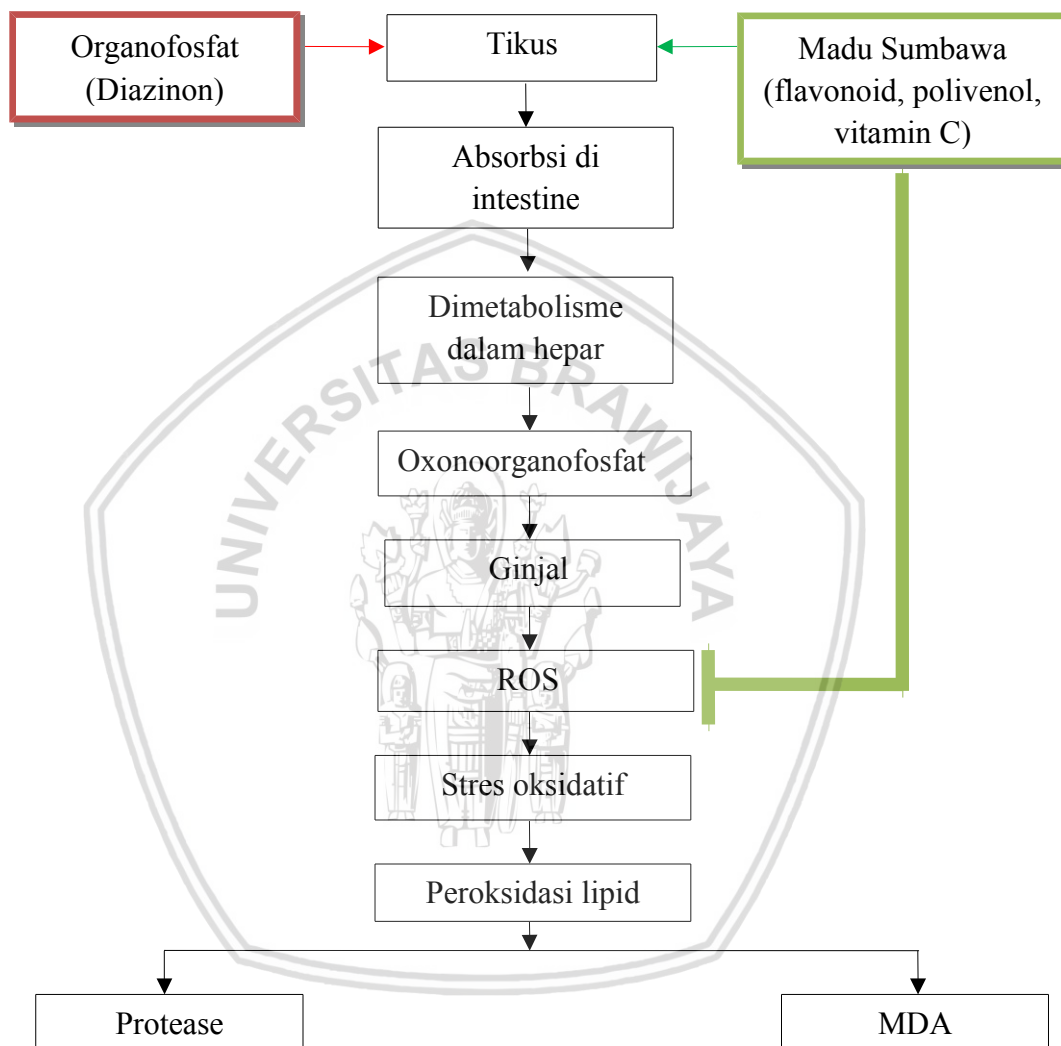
Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>norvegicus</i>



Tikus termasuk hewan mamalia, sehingga untuk hewan coba hasil yang didapat pada tikus tidak akan jauh berbeda dengan mamalia lain. Tikus memiliki lama hidup 2-3 tahun. Berat tikus dewasa 300-400 g untuk jantan dan 250-300 g untuk tikus betina dewasa. Tikus putih memiliki kelebihan dibanding tikus liar yaitu mudah dalam perawatannya, cepat dewasa dan lebih cepat untuk berkembang biak (Maula, 2014).

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 KERANGKA KONSEPTUAL



Keterangan :

→ : diinduksikan

← : terapi

⊥ : menghambat

↑ : meningkat

↓ : menurun

↓ : mempengaruhi

Pemberian diazinon yang diinduksikan secara per oral akan diserap oleh intestine dan dimetabolisme dalam hepar. Metabolisme diazinon dalam dosis rendah dapat dimetabolisme di dalam intestine dan pulmo. Pemberian diazinon dengan dosis tinggi menyebabkan metabolisme dalam intestine menjadi jenuh, sehingga memungkinkan toksik untuk lolos ke dalam vena porta. Diazinon bersifat lipofilik dan dapat berikatan dengan protein plasma sehingga dapat terdistribusikan ke hepar. Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh. Metabolisme diazinon sebagai xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase I dimana enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenai gugus fungsi OP dan fase II merupakan proses perubahan struktur OP menjadi molekul hidrofilik.

Metabolisme organofosfat fase I terdiri dari reaksi oksidasi yang merupakan suatu reaksi aktivasi tiono organofosfat menjadi okson organofosfat dan atom sulfur dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP). Sehingga Okson organofosfat menjadi molekul aktif yang mampu menghambat fungsi dari AChE. Reaksi hidrolisis termasuk dalam metabolisme fase I, dimana hidrolisis terjadi setelah reaksi oksidasi berlangsung dengan bantuan enzim *paraoxonase* (PON) reaksi ini penting untuk proses detoksifikasi. Fase II metabolisme diazinon merupakan proses perubahan struktur diazinon menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin, dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi.

Okson organofosfat yang bersifat aktif akan menyebar ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah dan masuk ke ginjal. Pemaparan okson organofosfat dapat

meningkatkan asetilkolin (ACh) sehingga keseimbangan ion dalam sel akan terganggu dan akan mempengaruhi produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) akan meningkat signifikan sebagai upaya respon oleh tubuh dan antioksidan endogenus akan mengalami penurunan setelah beberapa hari. *Reactive Oxygen Species* (ROS) akan terbentuk secara tidak terkendali akibat penurunan dari antioksidan endogenus. Pemberian diazinon pada tikus akan menyebabkan semua perubahan yang mengarah pada diazinon-mediated renal stres oksidatif dan toksisitas. Stres oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan antioksidan baik enzimatis ataupun non enzimatis. Proses peroksidasi lipid akan berlangsung bersama dengan peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS). Stres oksidatif yang menyebabkan nefrotoksik ini mempengaruhi aktivitas protease ginjal. Aktivitas protease secara normal pada ginjal berfungsi untuk memecah matrix protein agar tetap seimbang untuk mencegah terjadinya fibrosis. *Reactive Oxygen Species* (ROS) juga akan membentuk molekul stabil dengan mengambil elektron dari lipid yaitu atom hidrogen *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada membran sel dan akan menghasilkan molekul malondialdehid (MDA). Sehingga peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat meningkatkan kadar malondialdehid (MDA).

Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, E, polifenol, mangan, flavonoid, dan beberapa antioksidan lain. Antioksidan dalam madu Sumbawa dapat membantu antioksidan dalam tubuh yang akan menurunkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga dapat menurunkan kadar

malondialdehid (MDA) dan Protease pada ginjal tikus. Antioksidan akan menurunkan dampak negatif dari oksidan dengan cara memberikan elektronnya sehingga akan mengubah oksidan menjadi molekul yang tidak berbahaya. Antioksi dan juga mampu mencegah pembentukan radikal bebas dan memperbaiki kerusakan akibat adanya radikal bebas.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Pemberian madu Sumbawa efektif dalam menurunkan aktivitas protease pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
2. Pemberian madu Sumbawa efektif dalam menurunkan kadar MDA pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April 2018 yang bertempat di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang. Pembacaan kadar Malondialdehid (MDA) di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Pembacaan aktivitas protease di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya.

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba dengan berat badan 130-180 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari, ditempatkan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok dan besar sampel ditentukan dengan rumus *Federer* (Kusriningrum, 2010) :

$$P(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

P = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

berdasarkan perhitungan tersebut, maka perlakuan dibagi menjadi 5 macam diperlukan jumlah minimal 4 kali dalam setiap kelompok sehingga total tikus yang diperlukan adalah 20 ekor. Perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu,

K-, K+, P1, P2, dan P3. Kelompok K- merupakan kelompok kontrol sehat yang diberi minum *ad libitum* dan pakan basal. Kelompok K+ merupakan kelompok kontrol yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB diberikan secara per oral. Kelompok P1 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB dan diterapi dengan madu sumbawa konsentrasi 25% sebanyak 1 ml yang keduanya diberikan secara per oral. Kelompok P2 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB dan diterapi dengan madu sumbawa konsentrasi 50% sebanyak 1 ml yang keduanya diberikan secara per oral. Kelompok P3 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgbb dan diterapi dengan madu sumbawa dengan konsentrasi 75% sebanyak 1 ml yang keduanya diberikan secara per oral. Berikut diperinci pada **Tabel 4.1** Rancangan penelitian.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

KelompokPerlakuan	Perlakuan
Tikus Normal	Tanpa di beri diazinon dan tanpa terapi
Tikus Positif	Diazinon 60 mg/kg BB
Tikus perlakuan (1)	Diazinon 60 mg/kg BB, Madu Sumbawa 1 ml konsentrasi 25%
Tikus perlakuan (2)	Diazinon 60 mg/kg BB, Madu Sumbawa 1 ml konsentrasi 50%
Tikus perlakuan (3)	Diazinon 60 mg/kg BB, Madu Sumbawa 1 ml konsentrasi 75%

4.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus, botol minum, tempat makan tikus, lampu, sonde, spuit, mortir.

Pengujian *Malondialdehyde* (MDA) berupa pipet, stir bar, tabung, mikrosentrifugasi poliprolena, gunting, kertas saring, pinset, blander, mikroskop cahaya, semi-mikrokuvet, spektrofotometer, vortex, *magnetic stirrer*, *water bath*.

Pengujian aktivitas protease berupa seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas, mortar, mikro pipet, penangas air, waterbath, appendof, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi) Denley tipe BR401), inkubator (memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV, mikroskop cahaya (nikon BX-53), autoclaf, spuit, *hot plate*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat 130-180 gram, organofosfat (diazinon), *aquades*, makanan pellet. Bahan yang digunakan untuk pengujian kadar *Malondialdehyde* (MDA) yaitu organ duodenum *2-thiobarbiturat acid*, asam asetat glacial, natrium hidroksida, malondialdehida bis, PBS. Bahan yang digunakan untuk pengujian aktivitas protease yaitu *Cyclosporine-A*, Tri Chloro acetic Acid, tirosin, kasein, HCl, KCl, KH_2PO_4 , NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, *Tween*, NaN_3 1% . *Poly Methyl Sulfonyl Fluoride*, etanol absolut, Tris-HCl, KMnO_4 .

4.4 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba.
2. Pemberian diazinon pada tikus.
3. Terapi Madu Sumbawa pada masing masing perlakuan.

4. Pengambilan sampel organ ginjal.
5. Pengukuran kadar MDA.
6. Pengukuran aktivitas protease.
7. Analisis data.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini meliputi:

Variabel bebas	Dosis iinduksi diazinon dan madu Sumbawa
Variabel tergantung	: kadar MDA dan Aktivitas Protease
Variabel kontrol	: tikus (strain <i>Rattus norvegicus</i>)

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sehat dengan berat badan 130-180 gram yang sudah disertifikasi layak etik. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok dengan jumlah ulangan minimal 5 kali setiap kelompok perlakuan. Tikus diberikan pakan basal pada semua tikus selama 7 hari.

Kandang tikus dibuat menggunakan bak plastik dengan ukuran p.l.t = 30x45x20 cm yang dilengkapi dengan botol minum tikus dan serbuk gergaji sebagai alas. Kandang ini akan diberi tutup kayu dan kawat strimin agar tikus tidak kabur. Kandang-kandang bak plastik ini akan diletakkan di dalam rak besi siku 6 susun dan dalam satu rak besi dapat menampung 18 kandang tikus.

4.6.2 Induksi Diazinon

Dosis diazinon 60 EC yang diberikan pada setiap perlakuan sebanyak 60 mg/kgBB yang diinduksikan sekali setiap hari terbukti dapat menyebabkan

kerusakan pada hepar (Zulfa, 2016). Diazinon diencerkan dalam 100 ml labu ukur dengan dosis 9 mg/kgBB setiap ekor tikus sehingga dari diazinon 60 EC diambil sebanyak 15 mL untuk diencerkan dalam 100 mL akuades pada labu ukur. Diberikan secara peroral menggunakan sonde sebanyak 1 mL sekali setiap hari pada tikus kontrol positif, P1, P2, dan P3. Induksi diazinon dilakukan pada hari ke 8 sampai hari ke 14.

4.6.3 Terapi Madu Sumbawa

Terapi madu sumbawa diberikan per oral pada hari ke 14 sampai hari ke 25 setiap hari sebanyak 1 kali. Madu sumbawa diberikan sebanyak 0,25 ml diencerkan hingga mencapai volume 1 ml menggunakan akuades sebagai pengencer diinduksikan pada kelompok P1.

Kelompok P2 diberikan terapi madu sumbawa secara per oral pada hari ke 14 sampai hari ke 25 setiap hari sebanyak 1 kali. Madu sumbawa diberikan sebanyak 0,5 ml diencerkan hingga mencapai volume 1 ml menggunakan akuades sebagai pengencer.

Terapi madu sumbawa pada kelompok P3 diberikan per oral pada hari ke 14 sampai hari ke 25 setiap hari sebanyak 1 kali. Madu sumbawa diberikan sebanyak 0,75 ml diencerkan hingga mencapai volume 1 ml menggunakan akuades sebagai pengencer.

4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Ginjal

Pengambilan sampel organ ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke 26. Tikus dimatikan dengan cara *dislocatio os occipitale*

dan diletakkan di atas papan bedah secara rebah *dorsal*. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen dilanjutkan dengan pengambilan organ ginjal. Ginjal dipotong menggunakan gunting bedah dan dimasukkan dalam larutan PBS –azida pH 7,4 dalam pot organ dan disimpan dalam refrigerator (Wati, 2013).

4.6.5 Isolasi Protease

Sebanyak 0,5 gram ginjal dipotong kecil dan ditambah PBS-tween : PMSF dengan perbandingan 9:1. Kemudian ditambahkan sedikit pasir kuarsa dan digerus menggunakan mortar dingin di atas balok es sampai homogen. Setelah itu, ditambahkan 2 ml -tween : PMSF. Selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung propilen steril dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 menit. Dilanjutkan dengan proses sonikasi menggunakan sonikator selama 10 menit dan dilanjutkan dengan proses sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Diambil bagian supernatannya dan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1. Kemudian larutan dibiarkan semalam hingga terbentuk endapan. Kemudian disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm dan diambil endapannya. Endapan tersebut dikeringkan kemudian ditambahkan Tris HCl 0,02M pH 6,5 dengan perbandingan 1:1 (Wati, 2013).

4.6.6 Pengukuran Aktivitas Protease

Dicampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ l, buffer fosfat pH 7 sebanyak 300 μ l, dan enzim protease sebanyak 100 μ l. Kemudian didiamkan

selama 60 menit pada suhu 37°C di atas penangas air. Selanjutnya dilakukan proses sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Ditambahkan TCA 4% (b/c) dan ditunggu selama 30 menit pada suhu 27°. Diambil supernatan sebanyak 100µl dan diencerkan 5 kali volume buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansi pada λ_{maks} tirosin sebesar 275 nm (Wati, 2013).

Perhitungan aktivitas protease menggunakan rumus Walter (1984):

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

P = Jumlah Enzim (ml)

fp = faktor pengenceran.

4.6.7 Pengukuran Kadar MDA

Sebanyak 0,5 gram organ ginjal bersama sedikit pasir kuarsa digerus hingga halus menggunakan mortar. Kemudian ditambahkan NaCl-fisiologis sebanyak 200µl. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan akuades sebanyak 550µl dan TCA sebanyak 100µl. Kemudian dihomogenkan. Ditambahkan 250µl HCl 1N dan dihomogenkan. Ditambahkan 100µl Na-Thio 1% dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 500 rpm. Setelah disentrifugasi, supernatan diambil dan disaring menggunakan *glass wool*. Selanjutnya supernatan dipanaskan dalam *waterbath* suhu 100°C selama 20 menit dan dilanjutkan proses pendinginan pada suhu ruang. Terakhir, supernatan dihitung nilai absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal (Yustika, 2013).

4.6.8 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas protease dan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada organ ginjal. Analisa data yang digunakan berupa data kuantitatif untuk mengetahui nilai aktivitas protease dan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada organ ginjal menggunakan uji ANOVA serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha=5\%$, untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan.



BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Diazinon

Diazinon merupakan insektisida organofosfat yang banyak digunakan dalam bidang pertanian untuk membasmi hama pengganggu (Himawan, 2012). Diazinon memberikan efek terhadap hewan dapat berupa keracunan akut akibat terhambatnya enzim asetilkolinesterase yang berfungsi memecah neurotransmitter asetilkolin (ACh) (Yuningsih, 2010). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa tikus yang diberi diazinon menunjukkan gejala pasca 2-3 jam setelah induksi mengalami tremor serta diare yang ditandai perubahan warna serta tekstur feses tikus yang semakin lembek, perubahan perilaku suka menggigit jari dan kaki, serta munculnya sianosis pada hari ke-2 dan ke-3 pasca induksi serta menghilang pada hari ke-4. Hal ini sesuai dengan Ivanovic *et. al.* (2016) gejala keracunan pada tikus yang timbul setelah paparan sub kronik diazinon yaitu lakrimasi dan salivasi berlebih, kesulitan bernafas, tremor, perubahan perilaku tikus, bahkan diare. Menurut Hayes (2010), tikus yang mengalami intoksikasi diazinon secara akut menunjukkan adanya sianosis pada beberapa hari yang kemudian menghilang. Hal ini disebabkan akumulasi ACh pada reseptor muskarinik dan nikotinik pada sistem syaraf pusat.

Diazinon yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme di hepar menghasilkan oksono-organofosfat, sulfur, dan *leaving grup* yang bersifat aktif akan masuk dalam pembuluh darah dan masuk ke ginjal. Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Aktivitas protease merupakan kemampuan enzim protease untuk

memecah protein. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Aktivitas perotease diukur dengan menggunakan spektrofotometri dengan larutan kasein sebagai substrat didapat hasil sesuai pada (**Lampiran 6**). Hasil pengukuran aktivitas protease kemudian dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan *One-Way ANOVA* sesuai dengan (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.2 Rata-rata aktivitas protease ginjal tikus putih *Rattus norvegicus*

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease \pm SD (ng/mL)	Peningkatan Aktivitas Protease terhadap K- (%)	Penurunan Aktivitas Protease terhadap K+ (%)
Kontrol -	1,107 \pm 0,130 ^a	-	-
Kontrol +	1,452 \pm 0,063 ^b	45	-
Perlakuan 1	1,115 \pm 0,042 ^a	-	23
Perlakuan 2	1,235 \pm 0,075 ^a	-	15
Perlakuan 3	1,120 \pm 0,081 ^a	-	22

Keterangan : penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Hasil analisa aktivitas protease diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol positif diberi perlakuan induksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB tanpa diberi terapi madu Sumbawa diperoleh hasil rata-rata sebesar 1,452 ng/mL, sehingga diketahui berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(-) dengan peningkatan 45%.

Enzim protease yang terdapat pada kelompok kontrol negatif (K-) disebabkan oleh protease secara normal berada di dalam sel yang berfungsi untuk sinyal transduksi dan regulasi sel. Protease memiliki peran dalam sinyal transduksi untuk aktivasi hormon polipeptida, faktor perkembangan, dan pertahanan tubuh. Faktor

perkembangan yaitu pada perakitan kolagen dan prokolagen, serta berperan pada proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik oleh siklin, degradasi serta berperan pada kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Hardiany, 2013). Aktivitas protease dalam sel normal sampai saat ini belum didapatkan standar normalnya, sehingga nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif (K-) digunakan sebagai standar untuk diketahui adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi akibat dilakukannya perlakuan.

Peningkatan yang terjadi pada kelompok kontrol positif (K+) disebabkan oleh adanya induksi diazinon. Diazinon yang masuk didalam tubuh akan diubah oleh enzim *Cytochrome P450* menjadi diazoxon yang bersifat radikal bebas. Diazoxon akan menyebabkan stress oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih di dalam jaringan tidak ternetralisir oleh antioksidan dapat menyebabkan stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif akan menyebabkan kerusakan molekul seperti DNA, lipid, dan protein. Bila kondisi tersebut berlangsung dalam waktu lama dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Hussain et.al., 2016).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit paling luar dan bersifat sangat reaktif. Radikal bebas ini akan merusak membran sel yang mengandung asam lemak jenuh (PUFA) menjadi peroksidasi lipid yang tidak stabil. Proses peroksidasi lipid terdiri dari beberapa tahapan reaksi yaitu inisiasi, propogasi, dan terminasi. Tahap inisiasi terjadi saat atom hidrogen pada gugus metilen oleh ROS membentuk radikal karbon (L^{\cdot}). Tahapan propagasi terjadi saat radikal karbon akan bereaksi dengan

oksigen dimana akan terbentuk radikal peroksil (LOO^\bullet) dan berlanjut berikatan dengan atom hidrogen lipid lain membentuk hidrogen peroksida (LOOH) yang bersifat sitotoksik, sehingga terjadi reaksi berantai. Tahap terminasi akan terjadi saat radikal karbon yang terbentuk saat inisiasi ataupun radikal lain yang terbentuk pada tahap propagasi bereaksi dengan radikal lain membentuk produk non radikal (Setiawan dan Suhartono, 2007).

Kerusakan sel yang terjadi akibat adanya peroksidasi lipid yaitu disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran sel sehinggamenyebabkan keluarnya enzim dari sel (Surya,2013). Kerusakan sel akibat peroksidasi lipid dapat disebabkan juga oleh produk hasil peroksidasi lipid, diantaranya yaitu isoprostan (IsoP), Oksisterol, dan Aldehida (MDA dan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)). Isoprostan merupakan bahan yang menyerupai prostaglandin yang terbentuk sebagai hasil peroksidasi asam arakhidonat oleh radikal bebas melalui mekanisme autooksidasi (Kusuma, 2013). Menurut Yin et al., (2006), secara struktural prostaglandin memiliki kemiripan dengan isoprostan. Oksisterol merupakan derivat oksidatif kolesterol, yang berperan dalam berbagai proses biologis seperti homeostasis kolesterol, metabolisme sfingolipid, agregasi platelet, dan apoptosis. Aldehyd yang terdiri dari malondialdehyd (MDA) dan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) merupakan produk sekunder (turunan) yang terbentuk selama proses peroksidasi lipid sebagai produk pembusukan. HNE pada konsentrasi tinggi menyebabkan hilangnya homeostasis ion Ca , hambatan terhadap respirasi mitokondria dan sintesa protein, serta mampu menarik neutrofil dan menginduksi respon inflamasi pada sel (Kusuma, 2010). Radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan

infiltrasi sel-sel inflamasi yang dapat melepaskan enzim protease. keadaan inflamasi menyebabkan infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, monosit, dan limfosit. Pada bagian inflamasi, sel-sel inflamasi aktif melepaskan banyak enzim (protease netral, elastase, kolagenase, asam hidrolase, fosfatase, lipase) (Biswas, 2015). Sehingga, dapat diketahui bahwa adanya radikal bebas akibat induksi diazinon dapat meningkatkan aktivitas protease sel.

Kelompok perlakuan 1 (P1) yang diinduksi diazinon dan diterapi menggunakan madu Sumbawa konsentrasi 25% berbeda secara signifikan ($p > 0,05$) dengan kelompok K(+), didapat rata-rata 1,115 ng/mL dan secara biologis mengalami penurunan sebesar 70% dari K(+). Kelompok perlakuan 2 (P2) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% diperoleh rata-rata 1,235 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+) dan mengalami penurunan sebesar 60% dari K(+). Pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa 75% didapat rata-rata sebesar 1,120 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p > 0,05$) dengan kelompok K(+) dan mengalami penurunan sebesar 68% dari K(+).

Penurunan aktivitas pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dapat terjadi akibat adanya antioksidan yang terkandung dalam Madu sumbawa seperti polifenol, flavonoid, dan vitamin C. Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, E, polifenol, flavonoid, dan beberapa antioksidan lain (As'ari, 2009). Berdasarkan fungsinya antioksidan dibedakan menjadi 5 yaitu, antioksidan primer, sekunder, tersier, *oxygen scavenger*, dan *chelators and*

sequestants. Sebagai antioksidan primer berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas, contoh antioksidan ini adalah SOD. Antioksidan sekunder berfungsi sebagai senyawa penangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai mencegah kerusakan yang lebih besar, contoh antioksidan ini adalah flavonoid, vitamin C dan E. Antioksidan tersier merupakan antioksidan yang berfungsi memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak akibat radikal bebas, contoh antioksidan ini adalah metionin sulfoksi dan reduktase. *Oxygen scavenger* berfungsi mengikat oksigen sehingga tidak menghambat reaksi oksidasi. *Chelators and sequestant* merupakan senyawa antioksidan yang mengikat logam yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi (Purba, 2009).

Pemberian diazinon pada kelompok P1, P2, dan P3 menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dari diazoxon yang bersifat radikal bebas. Diazoxon akan menyebabkan stress oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). Hasil tahap propagasi adalah hidrogen peroksida (LOOH) yang bersifat sitotoksik dan akan menyebabkan reaksi berantai. Menurut Rohdiana (2001), penambahan antioksidan dapat memutus reaksi berantai pada proses peroksidasi lipid, seperti antioksidan sintesis, *Butylated hidroxy aniline* (BHA), *Butylated hidroxy toluen* (BHT), TBHQ ataupun antioksidan alami.

Flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan. Flavonoid bekerja menangkap atau menetralkan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) terkait dengan gugus OH fenolik, sehingga dapat memperbaiki keadaan jaringan yang rusak atau terhambatnya proses inflamasi (Asfari, dkk., 2016). Terhambatnya proses

inflamasi dapat menurunkan sel-sel inflamasi. Sehingga, aktivitas protease di dalam sel akan menurun. Flavonoid dapat menangkap radikal bebas dengan jalan reduksi senyawa radikal bebas sehingga menjadi senyawa yang stabil, sehingga menghambat kerusakan sel dan infiltrasi mediator inflamasi yang berakibat pada penurunan aktivitas protease (Pertiwi,2012).

Polifenol sebagai antioksidan alami dapat menurunkan stres oksidatif dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida dengan mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksi (-OH) polifenol membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi (Asfari, dkk., 2016). Penurunan stres oksidatif akan menyebabkan penurunan kerusakan molekul seperti DNA, lipid, dan protein. Penghambatan reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida menyebabkan penurunan peroksidasi lipid dimana peroksidasi lipid akan menyebabkan kerusakan sel secara langsung dan dari hasil produknya seperti 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Efek langsung yaitu terjadinya kerusakan pada struktur membran sel sedangkan efek secara tidak langsung melalui produk-produk metabolit dari peroksidasi lipid. Kerusakan sel yang terjadi akibat adanya peroksidasi lipid yaitu disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran sel sehingga menyebabkan keluarnya enzim dari sel (Surya,2013). Produk 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) pada konsentrasi tinggi menyebabkan hilangnya homeostasis ion Ca, hambatan terhadap respirasi mitokondria dan sintesa protein, serta mampu menarik neutrofil dan menginduksi respon inflamasi pada sel (Kusuma, 2010).

Sehingga polifenol dapat menurunkan aktivitas protease dengan cara menurunkan stres oksidatif dan menghambat reaksi berantai peroksidasi lipid.

Vitamin C sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, dan radikal hidroksil dan peroksil (Rohdiana, 2001). Seperti polifenol, vitamin C dapat menurunkan aktivitas protease dengan cara menurunkan stres oksidatif dan menghambat reaksi berantai perubahan superoksida menjadi radikal hidroksil.

Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% sebanyak 1 ml memiliki pengaruh dalam menurunkan aktivitas protease, karena nilai yang diperoleh berbeda secara signifikan ($p > 0,05$) dengan kelompok K(+) dan tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) dengan kelompok K(-). Keadaan kelompok K(-) merupakan kelompok yang dianggap sehat karena tidak adanya nilai standar aktivitas protease pada ginjal, kelompok P1, P2, P3 secara statistik memiliki aktivitas protease sama dengan kelompok tikus sehat. Pemberian madu Sumbawa dengan konsentrasi 25% merupakan konsentrasi yang baik, karena dengan konsentrasi tersebut sudah dapat menurunkan aktivitas protease ginjal akibat induksi diazinon. Peningkatan aktivitas protease yang berlebihan dapat merusak sel, protein, dan komponen matriks ekstraseluler pada epitel serta mengganggu fungsi protein dalam proses perbaikan sel (Pertiwi, 2013).

Madu Sumbawa memiliki nilai IC_{50} sebesar 23293,9 ppm (Sumarlin, dkk., 2014). Dari hasil tersebut diketahui bahwa madu Sumbawa memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah (tidak aktif) karena memiliki nilai $IC_{50} > 500$ ppm (Azmi, dkk., 2015). Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menghambat radikal bebas sebanyak 50% (Ridho, 2013). Dalam penelitian ini, penggunaan konsentrasi 25% madu Sumbawa sudah mampu menurunkan aktivitas protease ginjal yang diinduksi diazinon. Aktivitas antioksidan yang lemah pada madu Sumbawa maka dengan konsentrasi 25% hingga 75% mampu menurunkan aktivitas protease ginjal yang diinduksi diazinon.

5.2. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Diazinon

Pengukuran kadar malondialdehid(MDA) ginjal tikus putih pada setiap kelompok dilakukan dengan menggunakan metode uji *Thiobarbituric Acid* (TBA). Hasil didapat dari pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 532 nm (**Lampiran 6**). Hasil pengukuran kadar malondialdehid(MDA) selanjutnya dianalisis menggunakan *One-Way* ANOVA (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Rata-rata kadar malondialdehidginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA ± SD (ng/mL)	Penigkatan Kadar MDA (%) terhadap K-	Penurunan Kadar MDA (%) terhadap K+
Kontrol -	0,085 ± 0,035 ^a	-	-
Kontrol +	0,268 ± 0,067 ^b	73	-
P1	0,161 ± 0,040 ^a	-	40
P2	0,164 ± 0,048 ^a	-	38
P3	0,105 ± 0,028 ^a	-	60

Keterangan : penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Hasil analisa kadar malondialdehid (MDA) diperoleh bahwa kadar MDA pada kelompok kontrol negatif K(-) memiliki rata-rata sebesar 0,085 ng/mL. Keberadaan MDA merupakan indikator dimana terjadinya kerusakan sel yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi akibat adanya ikatan antara radikal bebas dengan asam lemak jenuh. Pembentukan radikal bebas di dalam tubuh dapat terjadi melalui reduksi oksigen menjadi air pada respirasi mitokondria menghasilkan superoksida anion (O_2^-), radikal hidroksil (OH), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Simanjutak, 2012). Sehingga, dapat diketahui bahwa MDA yang dihasilkan oleh kelompok kontrol negatif merupakan hasil dari metabolisme sel yang secara normal berjalan didalam tubuh.

Kelompok kontrol positif (K+) diberi perlakuan induksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB tanpa diberi terapi madu Sumbawa. Sehingga diperoleh hasil rata-rata sebesar 0,268 ng/mL, dan diketahui berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(-). Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh (Wulandari, 2006). Pemberian diazinon pada tikus dapat menyebabkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid ginjal; penurunan aktivitas antioksidan ginjal seperti katalase, glutathione peroxidase, glutathione reduktase, glukosa-6-fosfat dehidrogenase, dan glutathione S-transferase; peningkatan aktivitas transpeptidase c-glutamil dan reduktase quinon (Shah, 2010). Metabolisme diazinon sama seperti OP lain terjadi di hepar. Metabolisme xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase I dimana enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenai gugus fungsi OP dan fase II merupakan proses perubahan struktur OP menjadi molekul hidrofilik seperti asam

glukoronat, sulfat, glisin, dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi (Wulandari,2006).

Pemberian diazinon pada kelompok kontrol positif (K+) menyebabkan diazinon yang masuk didalam tubuh akan dirubah menjadi diazoxon yang bersifat radikal bebas dalam tubuh. Diazoxon akan menyebabkan stress oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). Salah satu produk akhir dari proses peroksidasi lipid adalah MDA. Mekanisme pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), sehingga lipid bersifat radikal. Radikal lipid ini bereaksi dengan atom oksigen (O_2) membentuk radikal peroksil ($\cdot\text{OO}$), yang selanjutnya menghasilkan MDA (Yustika, 2013).

Kelompok perlakuan 1 (P1) yang diinduksi diazinon dan diterapi menggunakan madu Sumbawa konsentrasi 25% berbeda secara signifikan ($p<0,05$) dengan kelompok K(+),didapat rata-rata 0,161 ng/mL dan secara biologis mengalami penurunan sebesar 39% dari K(+). Kelompok perlakuan 2 (P2) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% diperoleh rata-rata 0,164 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p<0,05$) dengan kelompok K(+), dan pemberian madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% mengalami penurunan sebesar 38% dari (K+). Pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa 75% didapat rata-rata sebesar 0,105 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p<0,05$) dengan kelompok K(+) dan mengalami penurunan sebesar 60% dari K(+).

Penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dapat terjadi akibat adanya antioksidan yang terkandung dalam Madu sumbawa seperti polifenol, flavonoid, dan vitamin C. Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi dapat disebabkan oleh 4 macam reaksi yaitu: (1) pelepasan hidrogen dari antioksidan, (2) pelepasan elektron dari antioksidan, (3) penambahan lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, (4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Sayuti, 2015). Flavonoid mampu menghambat proses peroksidasi lipid dengan cara mendonorkan satu atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) fenolik saat bereaksi dengan radikal bebas (Kamilatussaniah, dkk., 2015).

Flavonoid memiliki mekanisme sebagai antioksidan yang bersifat secara langsung dan tidak. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan secara langsung yaitu dengan cara mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek radikal bebas. Sedangkan mekanisme tidak langsung flavonoid yaitu meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme, salah satunya yaitu aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) yang merupakan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti gen SOD (Kamilatussaniah, dkk., 2015). Mekanisme aktivasi sintesis enzim antioksidan endogen dapat terjadi saat mekanisme flavonoid sebagai antioksidan yang secara langsung dapat menangkap radikal bebas bekerja tidak efektif (Watson, 2014). Peningkatan kadar antioksidan di dalam tubuh dapat menurunkan

stres oksidatif sehingga proses peroksidasi lipid menurun dan berakhir dengan penurunan kadar MDA.

Polifenol yang terdapat dalam madu Sumbawa dapat menurunkan kadar MDA pada tikus yang diinduksi diaiznon dengan cara menangkap radikal bebas. Polifenol sebagai antioksidan alami dapat menurunkan stres oksidatif dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidroperoksil dengan mendonorkan atom hidrogen dari kelompok aromatik hidroksi (-OH) polifenol membuangnya dari dalam tubuh melalui sistem ekskresi (Asfari, dkk., 2016). Vitamin C sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, dan radikal hidroksil dan peroksil (Rohdiana, 2001).

Penghambatan reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida sehingga menyebabkan penurunan peroksidasi lipid. Tiga produk hasil peroksidasi lipid yang secara biologis berperan penting diantaranya yaitu isoprostan (IsoP), Oksisterol, dan Aldehida (MDA dan 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)) (Kusuma, 2010). Sehingga dengan penurunan peroksidasi lipid dan penghambatan reaksi berantai peroksidasi lipid oleh flavonoid, polifenol, vitamin C yang terkandung dalam madu Sumbawa dapat menurunkan kadar MDA.

Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa kelompok P1, P2, dan P3 memiliki pengaruh dalam menurunkan kadar MDA, karena nilai yang diperoleh berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+) dan tidak berbeda

signifikan ($p>0,05$) dengan kelompok K(-). Pemberian madu dengan konsentrasi 25% pada kelompok P1 sudah mampu menurunkan kadar MDA pada ginjal tikus putih, karena memiliki penurunan sebesar 40% terhadap kelompok kontrol positif. Dalam penelitian ini, penggunaan konsentrasi 25% madu Sumbawa sudah mampu menurunkan kadar MDA ginjal yang diinduksi diazinon. Aktivitas antioksidan yang lemah pada madu Sumbawa maka dengan konsentrasi 25% hingga 75% mampu menurunkan kadar MDA yang diinduksi diazinon.



BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan :

1. Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25% merupakan konsentrasi yang baik untuk menurunkan aktivitas proteaseginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi diazinon dengan penurunan sebesar 23%.
2. Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25% merupakan konsentrasi yang baik untuk menurunkan kadar *Mallondialdehyde* (MDA) ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi diazinon dengan penurunan sebesar 40%

6.2. Saran

1. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dosis efektif madu Sumbawa.
2. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut pada organ lain terhadap pengaruh pemberian madu Sumbawa terhadap tikus putih yang diinduksi diazinon.

DAFTAR PUSTAKA

- As'ari, H. 2009. *Efek Pemberian Madu terhadap Kerusakan Sel Hepar Mencit (Mus musculus) Akibat Paparan Parasetamol*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Asfari, R. Kusmiyati. Merta, W. J. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Biologi Tropis, Januari 2016: Volume 16 (1) : 49-55*
- Azrini, R. Aulanni'am. Wuragil D. K. 2012. *Aktivitas Enzim Protease dan Gambaran Histopaologi Ginjal Pada Tikus (Rattus Norvegicus) Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Azmi, A.N. Yuniarta. 2015. *Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei (Morus alba. L) Metode Microwave Assisted Extraction (Kajian Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan : Pelarut)*. FTP. Universitas Brawijaya. Malang
- Azrizal, M. T. Perbandingan Pemberian Madu Hutan dan Madu Budidaya pada Menit Ke-30 terhadap Glukosa Darah Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung Angkatan 2015. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Berawi, K. N. Theodora, A. 2017. *Efek Aktivitas Fisik pada Proses Pembentukan Radikal Bebas sebagai Faktor Risiko Ateriosklerosis*. Majority. Vol. 6 No. 2
- Biswas, S.K. 2015. *Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?*. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Vol. 2016. Article ID 5698931.
- Chayati, I. Isnatin, M. 2015. *Pengembangan Ekstrak Flavonoid Madu Monoflora sebagai Ingredient Minuman Fungsional Tinggi Antioksidan*. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Cresna. Mery N. Ratman. 2014. *Analisis Vitamin C pada Buah Pepaya, Sirsak, Srikaya, dan Langsat yang Tumbuh di Kabupaten Donggala*. J. Akad. Kim. 3(3): 58-65.
- Davey, Patrick. 2005. *Medicine At A Glance*. Alih Bahasa: Rahmalia. A,dkk. Jakarta: Erlangga
- Dhianawaty, Diah dan Ruslin. 2013. *Kandungan Total Polifenol dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Metanol Akar Imperata cylindria (L) Beauv. (Alang-alang)*. Departemen Biokimi dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Univ. Padjajran : Bandung.
- Djumadi. Hariyatmi. Hanfi, S. 2008. *Pengaruh Pemberian Insektisida Diazinon Dan Kurkumin Kunyit (Curcuma Domestica) Per-Oral Terhadap Perubahan Struktur Histologis Duodenum Mencit (Mus Musculus)*.

Jurusan Pendidikan Biologi FKIP. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.

- Elërsek, T., and F. Metka. 2011. *Organophosphorus Pesticides- Mechanisms of Their Toxicity*. National Institute of Biology. Slovenia.
- Elling, B. K. M. Elling. A. Aos. 2015. *Anatomy & Physiology for the: Prehospital Provider*. Jones & Barlett publisher.
- Haeria, H. A. T. Ugi. 2016. *Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (Ziziphus spina-christi L.)*. Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences 2016 1(2):PP 57-61.
- Hardiany, N. S. 2013. *Cathepsin dan Calpain : Enzim Pemecah Protein dalam Sel Cathepsin and Calpain : Proteolytic Enzyme in Cell*. Departemen Biokimia & Biologi Molekuler. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Hayes, W.J., Jr., E.R. Laws, Jr., (eds.). *Handbook of Pesticide Toxicology. Volume 3. Classes of Pesticides*. New York, NY: Academic Press, Inc., 2010., p. 1052
- Heritance. 2018. *Gross Anatomy of Rat Kidney*. <http://heritance.me/gross-anatomy-of-rat-kidney>. diakses pada 27 Juni 2018.
- Himah, S. 2017. *Aktivitas Hepatoprotektor Tepung Kedelai (Glycine max L.) terhadap Peningkatan Kadar MDA Hati Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Diazinon*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember. Jember.
- Himawan, H. 2012. *Penetapan Kadar Residu Diazinon Pada Buah Stroberi (Fragaria Sp.) Setelah Pencucian Dengan Menggunakan Metode GC-MS*. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Hudri, F.A. 2014. *Uji Efektivitas Ekstrak Madu Multiflora dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Salmonella typhi*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Hussain, T. Ble, T. Yulong, Y. Francois, B. 2016. *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?*. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Volume 2016, Article ID 7432797.
- Ivanovic, Sasa R.; Dimitrijevic, Blagoje.; Cupic, Vitomir.; Jezdimirovic, Milanka. 2016. *Downregulation of Nicotinic and Muscarinic Receptor Function in Rats after Subchronic exposure to Diazinon*. [Jurnal] Departement of Pharmacology and Toxicology. Belgrade : Serbia.
- Kamilatussaniah, A, Yuniastuti. RS Iswari. 2015. *Pengaruh Suplementasi Madu Kelengkeng terhadap Kadar TSA dan MDA Tikus Putih yang Diinduksi Timbal*. Jurnal MIPA 38 (2) (2015) : 108-114.

- Kusuma, J. 2010. *Peranan Peroksidasi Lipid pada Patogenesis Preeklamsia*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.
- Kusriningrum, . R. S. 2008. *Perancangan Percobaan : Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan, Farmasi*. Cetakan I. Surabaya : Airlangga University Press.
- Lavenia, A. 2010. *Penghambatan Peroksidasi Lipid oleh Ekstrak Kulit Batang Mahoni (Swietenia macrophylla King) pada Tikus Hiperurisemia*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Legowo, G. 2015. *Manfaat Madu sebagai Antioksidan dalam Melawan Radikal Dari Asap Rokok untuk Menjaga Kualitas Sperma*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Lampung.
- Maula, I. F. 2014. *Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Pada Tikus Putih Jantan (Rattus norvegicus) Galur Sprague dawley Secara In Vivo*. [SKRIPSI]. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Nofianti, T. Windiarti, D. Prasetyo, Y. 2015. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Krop Kubis Putih (Brassica oleracea L. var capitata) terhadap kadar Kolesterol Total dan Trigliserida Serum Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar*. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada. Volume 14 Nomer 1
- Pertiwi, H.O.M. Aulanni'am. Herawati. 2012. *Aktivitas Protease dan Gamabran Histopatologi Epitel Bronkus Akibat Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (Minosa pudica Linn.) terhadap Hewan Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Poet, T. S., A. A. Kousba, C. Timchalk. 2004. *Hepatic and Intestinal Metabolism of the Organophosphate Pesticides Chlorpyrifos and Diazinon*. Toxicological sciences 72. Chemical Dosimetry. Washington.
- Purba, E. R. 2009. *Kurkumin sebagai Senyawa Antioksidan*. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains IV, No.3:607-621.
- Redha, A. 2010. *Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Perannya dalam Sistem Biologis*. Jurnal Belian Vol.9 No.2 Sep. 2010: 196-202.
- Ridho, E.A. 2013. *Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia trifolia) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Rohdiana, D. 2001. *Aktivitas Penangkapan Radikal Polifenol Dalam Daun Teh*. Majalah Farmasi Indonesia (1). 52-58.
- Sayuti, Kesuma. Rina, Y. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Andalas University Press. Padang.
- Shah, M. D. Iqbal, M. 2010. *Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats*. Universiti Malaysia Sabah. Malaysia.

- Singh, Z. 2014. *Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies : a Review*. Iranian J Publ Health, Vol. 43, pp 7-16.
- Sinha, P.K. Sharma, A. 2003. *Organophosphate poisoning : A review*. Department Medicine, Indira Gandhi Medical College Vol 12, No.2. Shimla. India.
- Sumarlin, L.O. A. Muawanah. P. Wardhani. Masitoh. 2014. *Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Madu di Pasaran Lokal Indonesia*. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia. Vol. 19 (3): 136-144.
- Sumbono, A. 2016. *Biokimia Pangan Dasar*. Deepublish. Yogyakarta.
- Surya, I.G.P. 2013. *Kadar Malondialdehyde (MDA) pada Abortus Inkomplit Lebih Tinggi Dibandingkan dengan Kehamilan Normal*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.
- Usman, M. R. 2013. *Kinetika fotokatalisis diazinon dengan titanium dioksida (TiO_2)*. [SKRIPSI]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember.
- Verdiansyah. 2016. *Pemeriksaan Fungsi Ginjal. Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik*. Rumahsakit Hasan Sadikin. Bandung.
- Wati, I. P. Aulanni'am. Mahdi, C. 2013. *Aktivitas Protease Dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Watson, R.R. 2014. *Polyphenols in Human Health and Disease : vol.1*. Elsevier. Amsterdam.
- Wulandari, T. 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sambilo (Andrographis paniculata Ness.) Terhadap Struktur Mikroanatomi Hati Dan Kadar Glutamat Piruvat Transaminase Serum Mencit (Mus musculus L.) Yang Terpapar Diazinon*. [SKRIPSI]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Yuningsih. 2010. *Penggunaan Asetonitril, MgSO_4 dan NaCl untuk Analisa Residu Pestisida DDE (Insektisida Organoklorin), Diazinon dan Fention (Insektisida Organofosfat) Dalam Pakan Ternak Dengan Cara Khromatografi Lapis Tipis*. Balai Besar Veteriner. Bogor.
- Yuningsih dan Sri Yulastuti. 1998. *Hasil Pemeriksaan Pestisida Fenthion (Insektisida Organofosfat) Dalam Bahan Baku Pakan, pakan Domba Dan Isi Lambung Kambing*. Balai Besar Veteriner. Bogor.
- Yuslianti, E.R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. CV Budi Utama. Yogyakarta.
- Yustika, A. R. Aulanni'am. Prasetya S. 2013. *Kadar Malondialdehid (Mda) Dan Gambaran Histopatologi Pada Ginjal Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.

Zulhawa, D. J. 2010. *Daya Hambat Madu Sumbawa terhadap Pertumbuhan Kuman Staphylococcus aureus Isolat Infeksi Luka Operasi Rs Islam Amal Sehat Sragen*. [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

